

植物由来ペプチドの 抗真菌剤への応用

新潟大学 工学部工学科
材料科学プログラム
准教授 落合 秋人

2024年12月19日

既存の抗真菌薬とその問題点

既存抗真菌薬

系統	一般名
イミダゾール系	ルリコナゾール
	ラノコナゾール
	ケトコナゾール
	ネチコナゾール
	ビホナゾール
モルホリン系	アモロルフィン
チオカルバミン酸系	リラナフタート
アリルアミン系	テルビナフィン
ベンジルアミン系	ブテナフィン

ミズムシなどの表在性真菌症の治療には、5種類に大別される抗真菌薬が現在使用されており、

- ・細胞膜に作用するメカニズムが単一である
- ・臓器障害や皮膚症状などの副作用が存在する

などの諸問題があり、新たな選択肢が求められている。

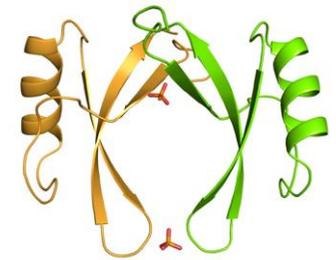
生体防御ペプチドとしてのディフェンシン

ディフェンシン

- 約50残基のアミノ酸で構成される抗菌タンパク質の一種
- 生体防御に関わる先天性免疫物質として様々な生物種に存在
- 分子内に形成された複数のジスルフィド結合により熱や分解酵素に対し高い安定性を発揮

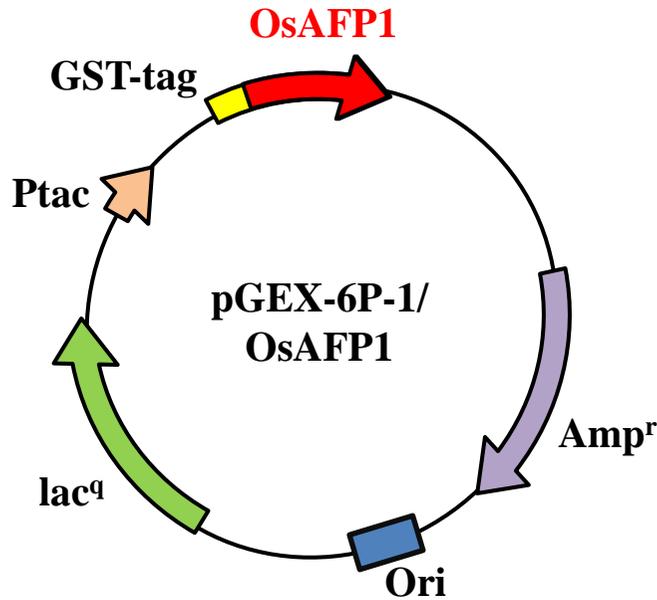
イネ由来ディフェンシン

- イネの病原性微生物の感染や様々なストレスに応答する防御ペプチドとして発見



組換えOsAFP1の調製

発現システム



Ptac: tacプロモーター
lacI^q: lacリプレッサー
ori: 複製起点
Amp^r: β-ラクタマーゼ(アンピシリン耐性)

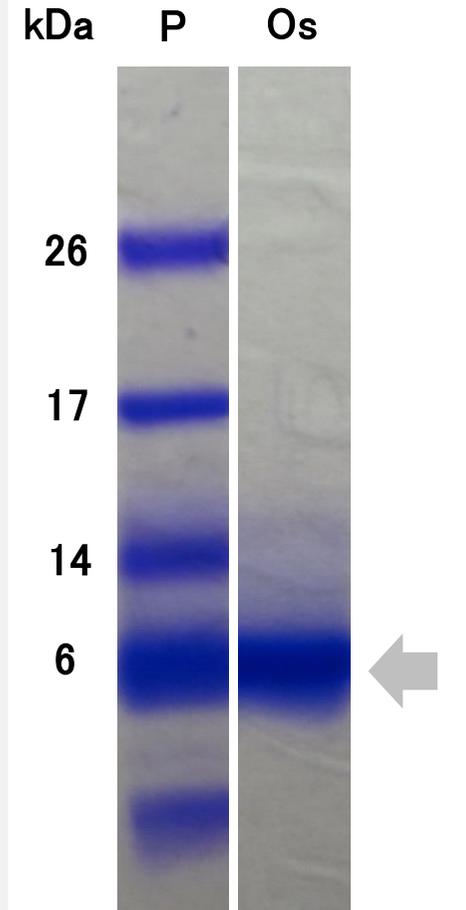
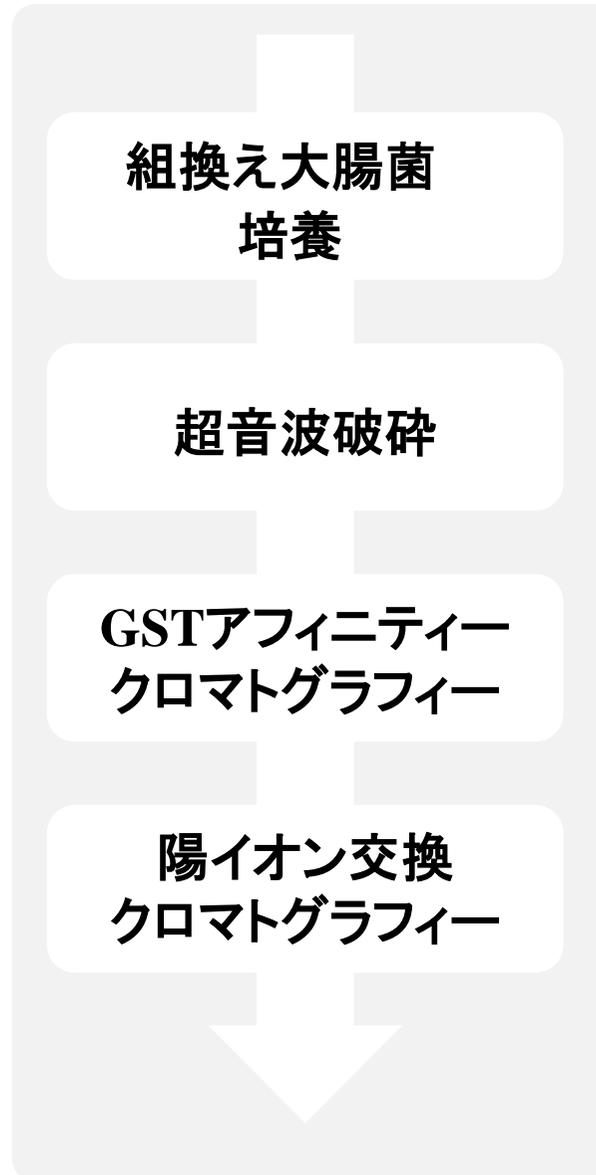
<発現宿主>

E. coli
Rosetta-gami B
(DE3) pLysS

<培養・発現条件>

- 培養温度 : 30→16°C
- 培養時間 : 24 h
- IPTG濃度 : 100 μM

精製



P : Peptide marker
Os : 精製OsAFP1

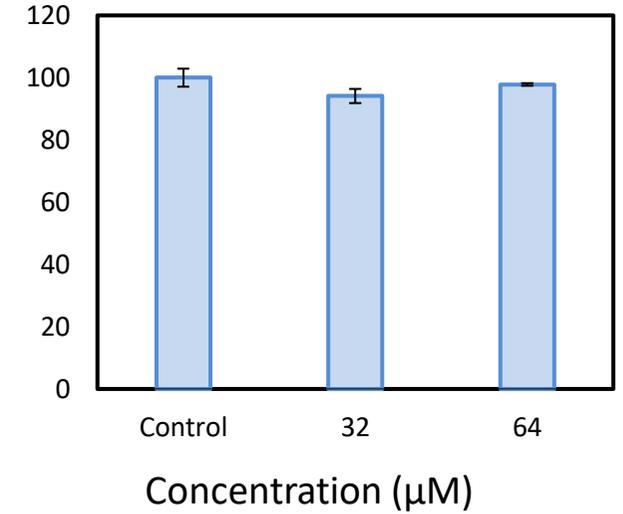
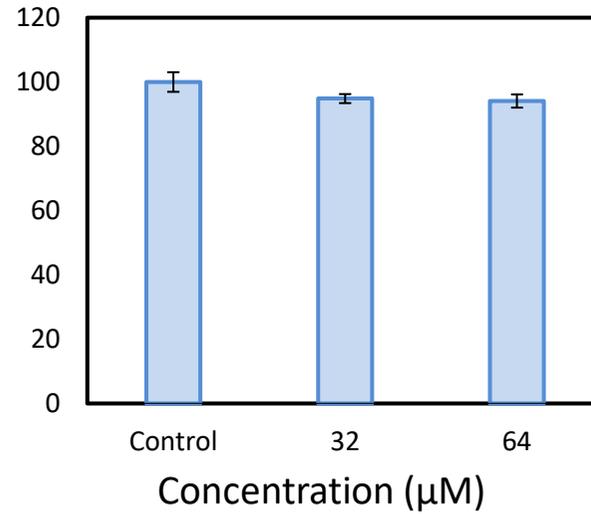
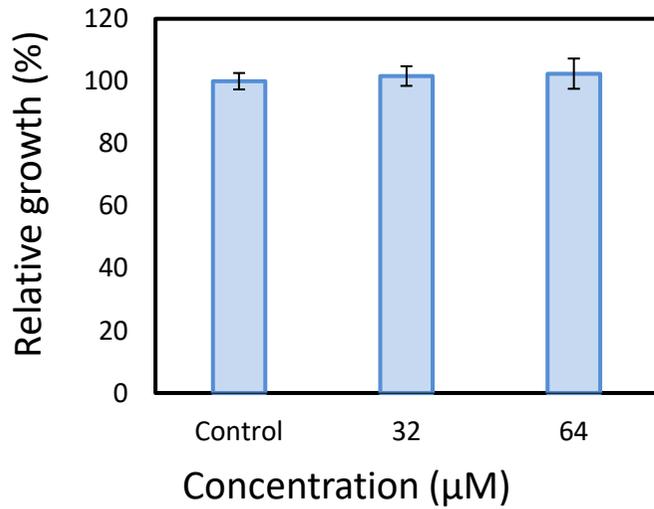
細菌類に対するOsAFP1の抗菌スペクトル

グラム陽性菌

Streptococcus mutans JCM5705

Staphylococcus aureus NBRC12732

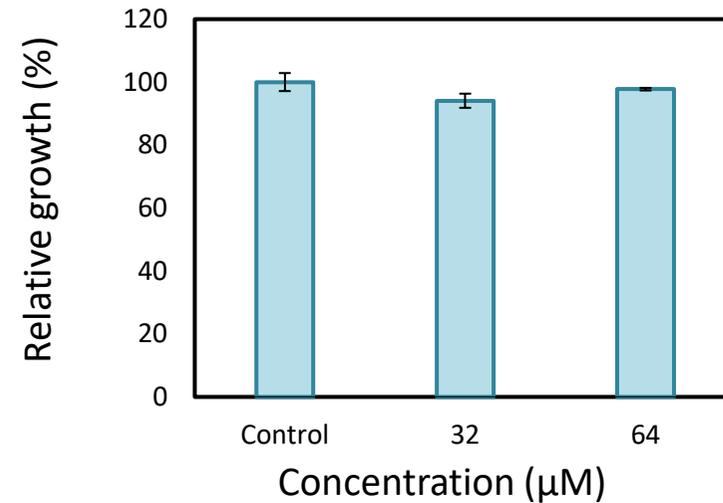
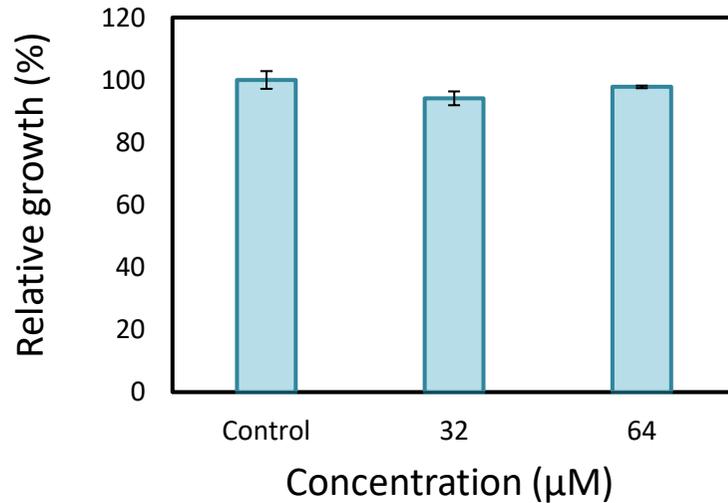
Propionibacterium acnes JCM6473



グラム陰性菌

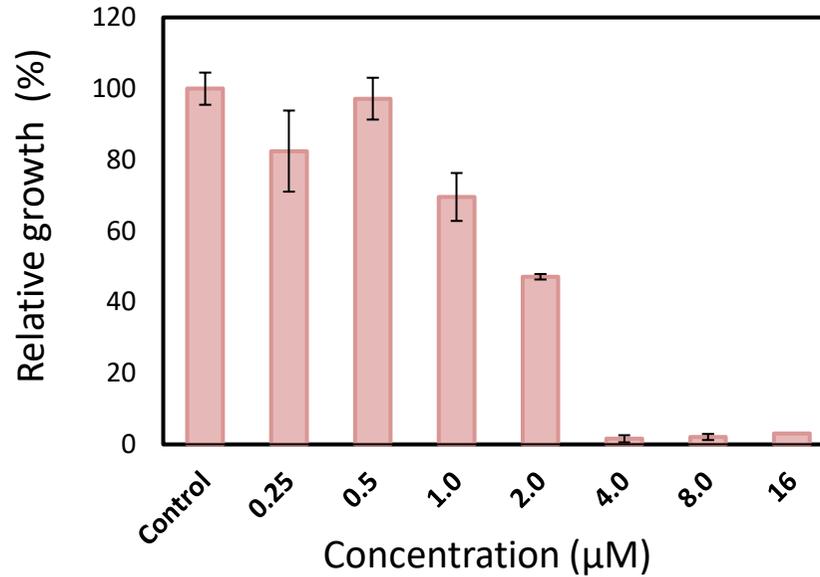
Porphyromonas gingivalis ATCC33277

Escherichia coli K-12

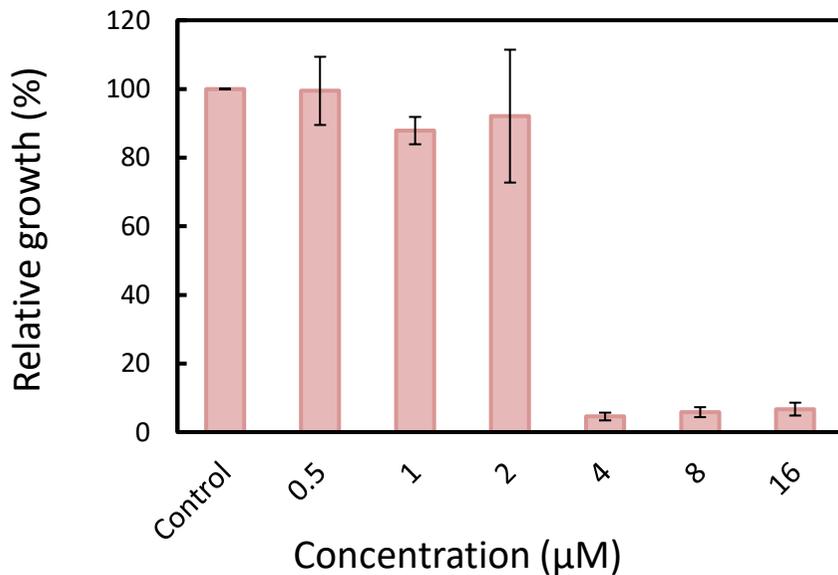


真菌類に対するOsAFP1の抗菌スペクトル

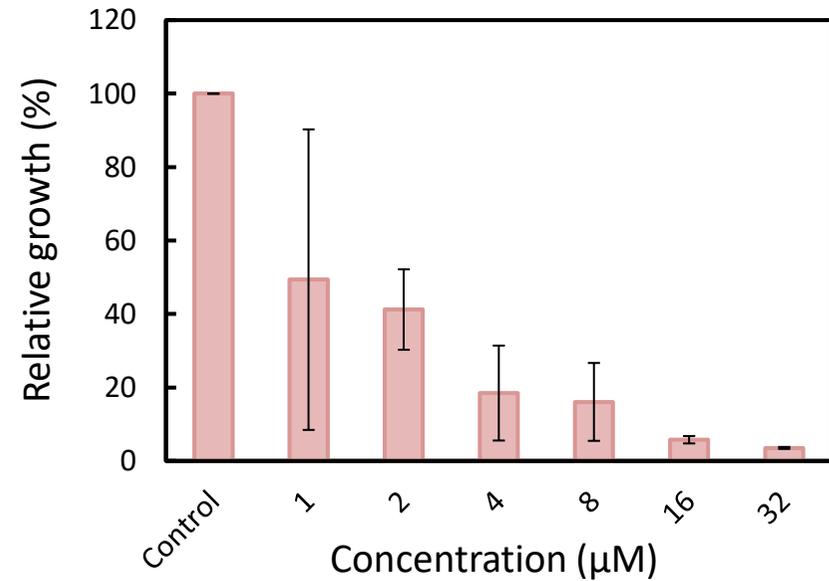
Candida albicans CAI4



Saccharomyces cerevisiae BY4742



Saccharomyces cerevisiae S288C



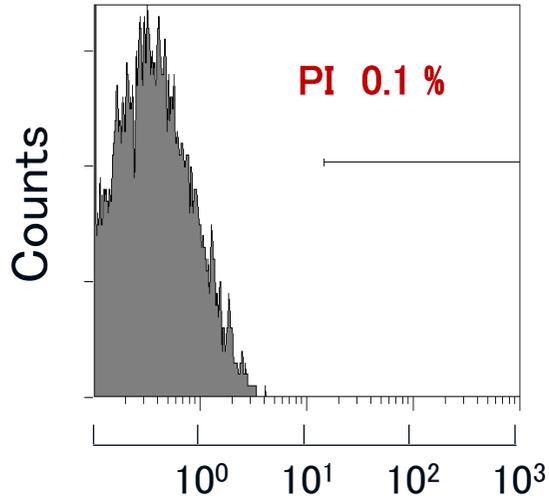
OsAFP1の抗菌スペクトル

種別	試験微生物	IC ₅₀ (μM)	MIC (μM)
グラム陽性細菌	<i>Streptococcus mutans</i> JCM5705	> 64 μM	> 64 μM
	<i>Staphylococcus aureus</i> NBRC 12732	> 64 μM	> 64 μM
	<i>Propionibacterium acnes</i> JCM 6473	> 64 μM	> 64 μM
グラム陰性細菌	<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277	> 64 μM	> 64 μM
	<i>Escherichia coli</i> K-12	> 64 μM	> 64 μM
真菌	<i>Candida albicans</i> CAI4	2 μM	4 μM
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4742	3 μM	4 μM
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C	12 μM	16 μM

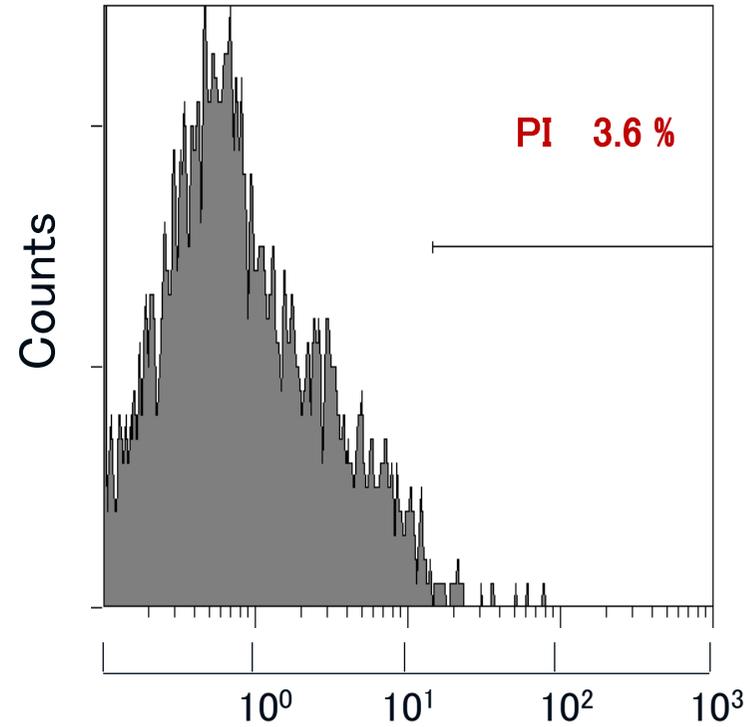
IC₅₀ : Half maximal (50%) inhibitory concentration
MIC : Minimum inhibitory concentration

C. albicans 細胞膜への相互作用

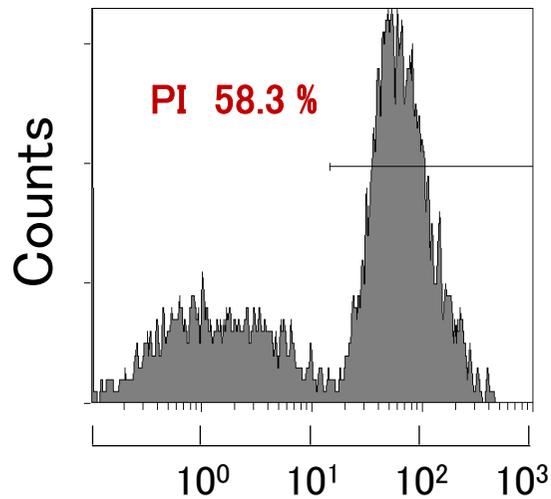
Control



OsAFP1



Melittin



Propidium iodide (PI)

損傷した細胞膜を透過する死細胞の
核酸染色蛍光色素

OsAFP1によるアポトーシス誘導の経時観察

未処理

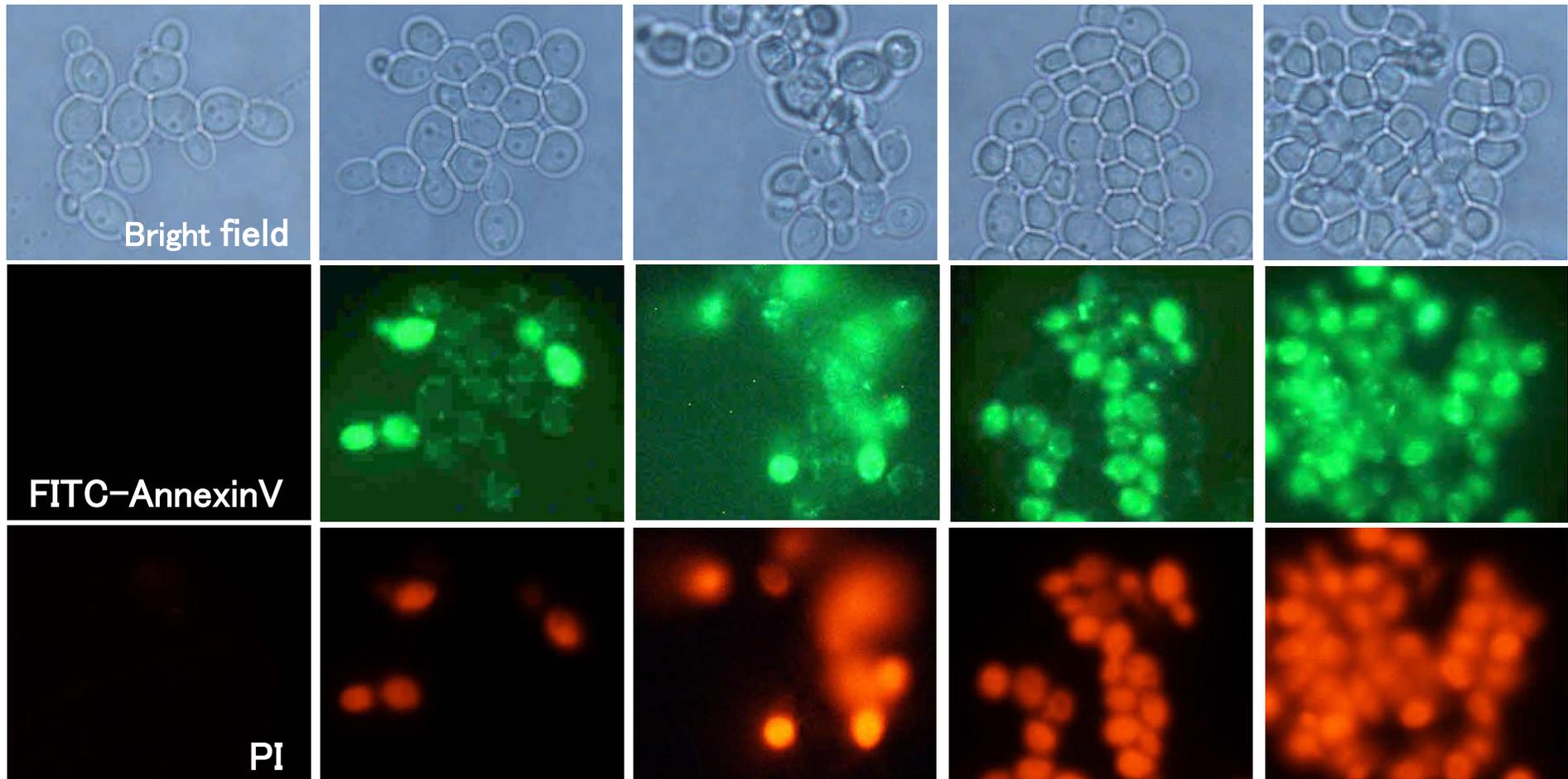
OsAFP1処理

0.5 h 後

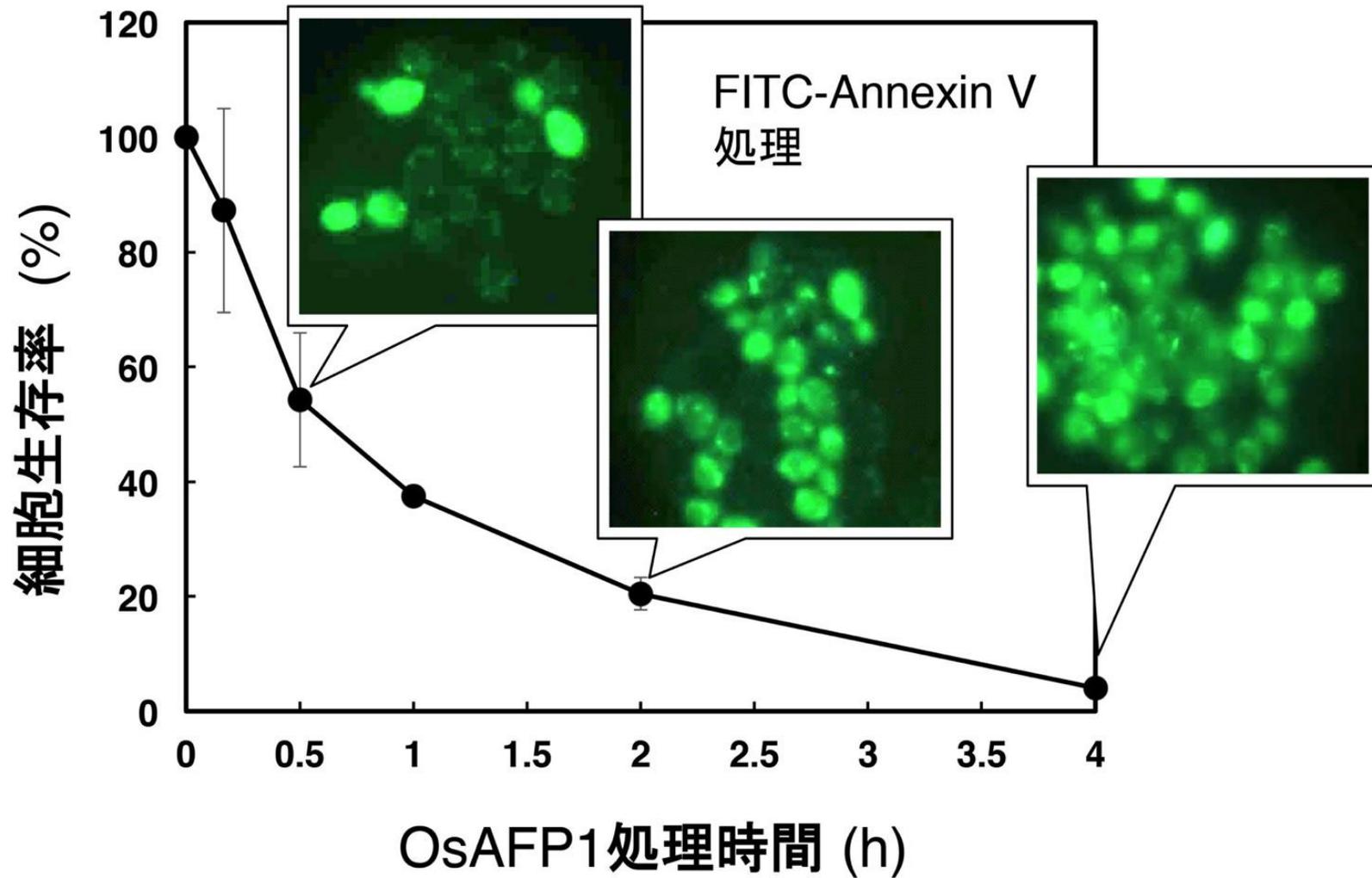
1 h 後

2 h 後

4 h 後

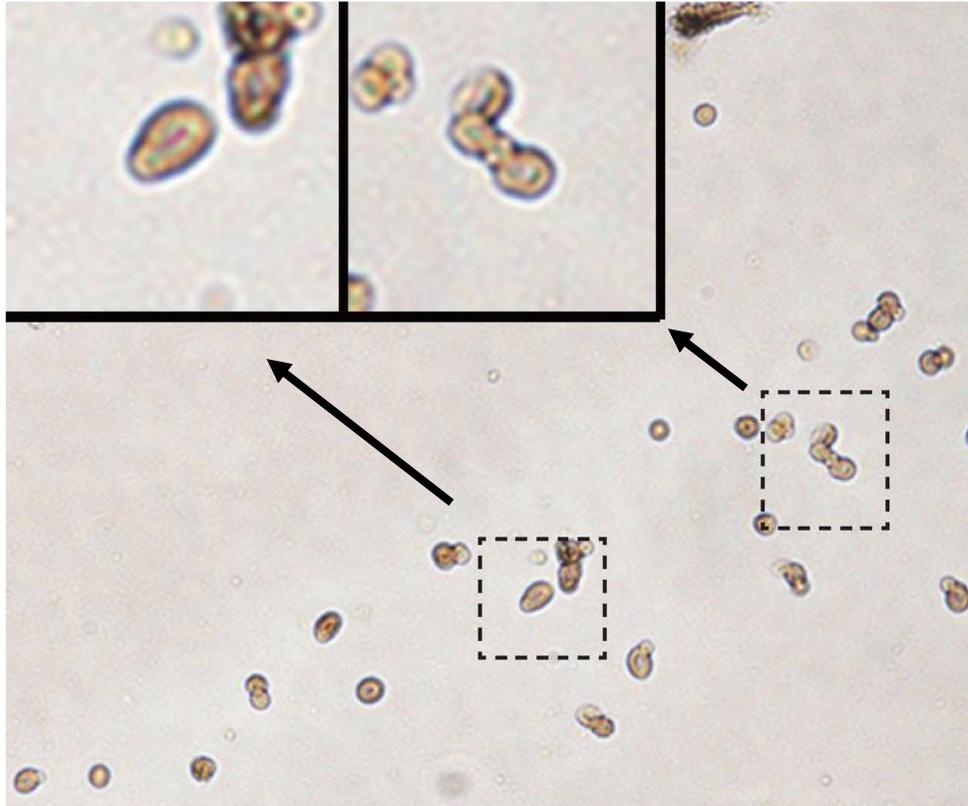


OsAFP1のアポトーシス誘導による殺菌的作用



免疫細胞化学(ICC)染色による標的分子の探索

未処理



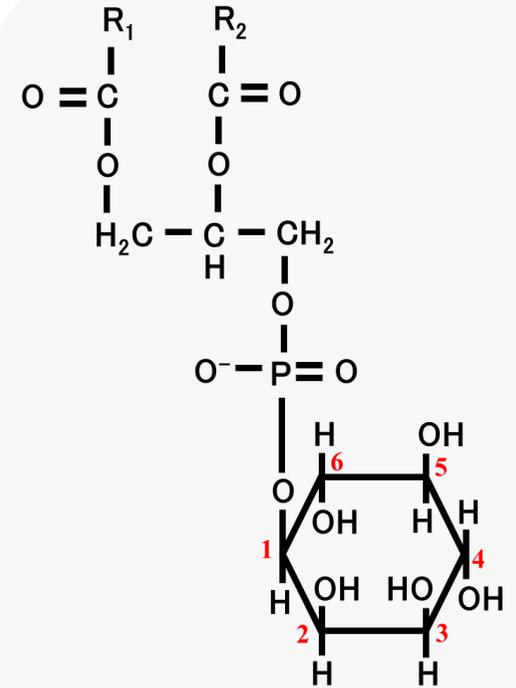
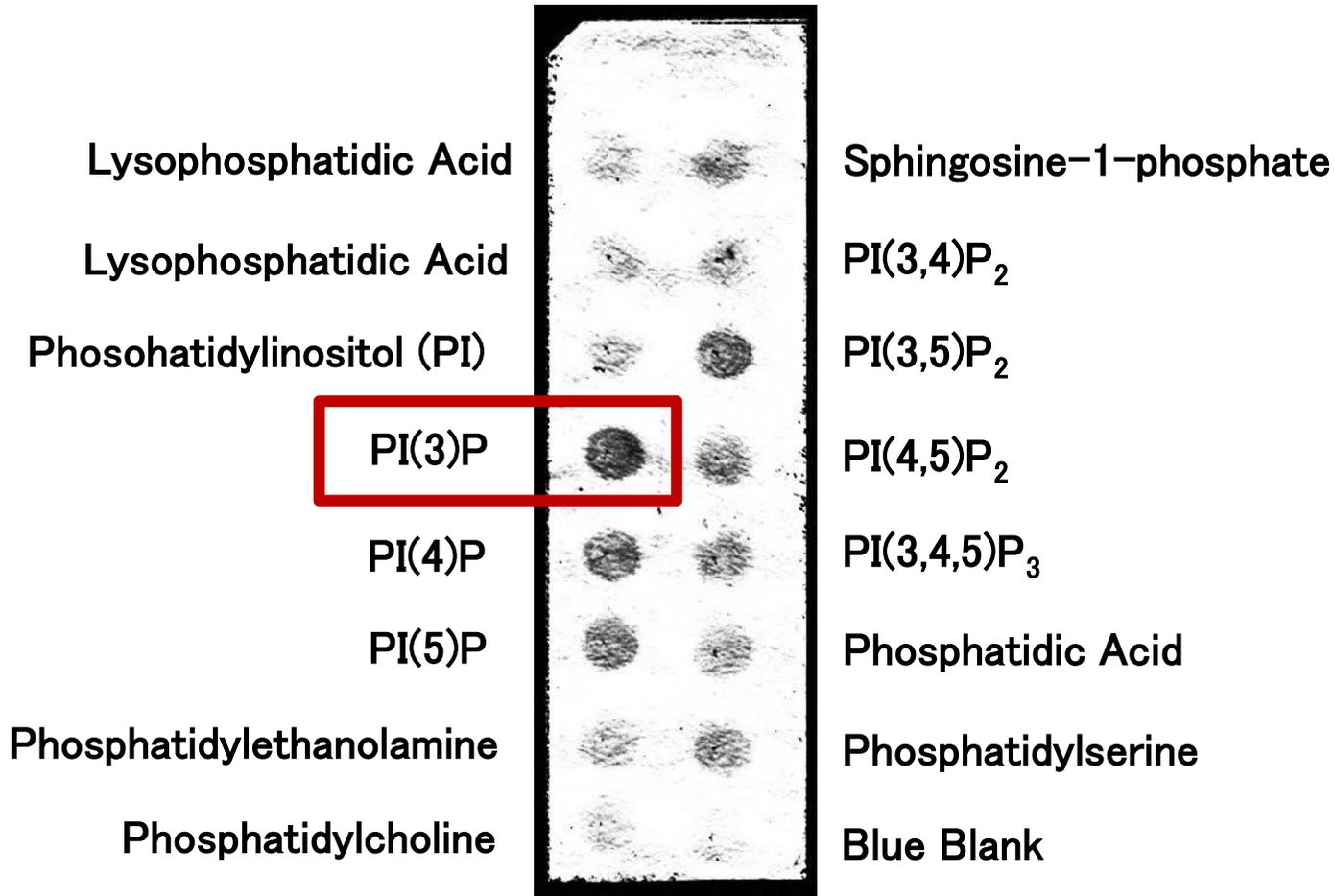
OsAFP1処理



- 細胞数 : 2×10^5 cells/mL
- 処理時間 : 0.5 h

- OsAFP1濃度 : $16 \mu\text{M}$ (MIC $\times 4$)
- インキュベート温度: 30°C

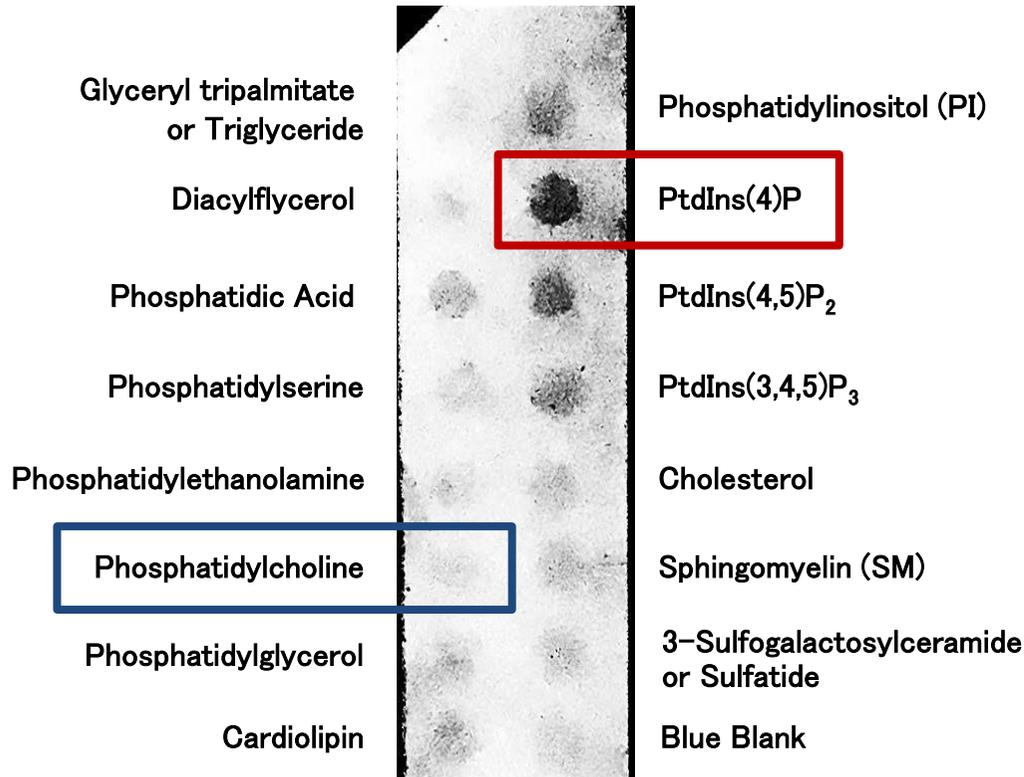
脂質結合特異性 (PIP Strips)



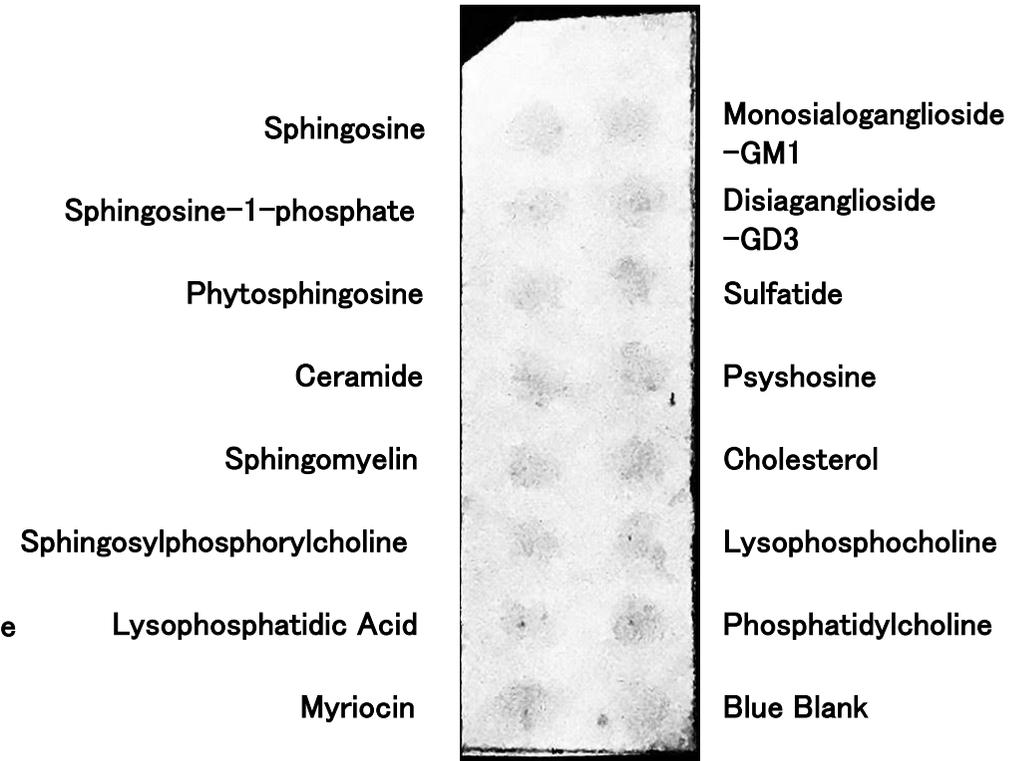
ホスファチジル
イノシトール(PI)

脂質結合特異性 (その他)

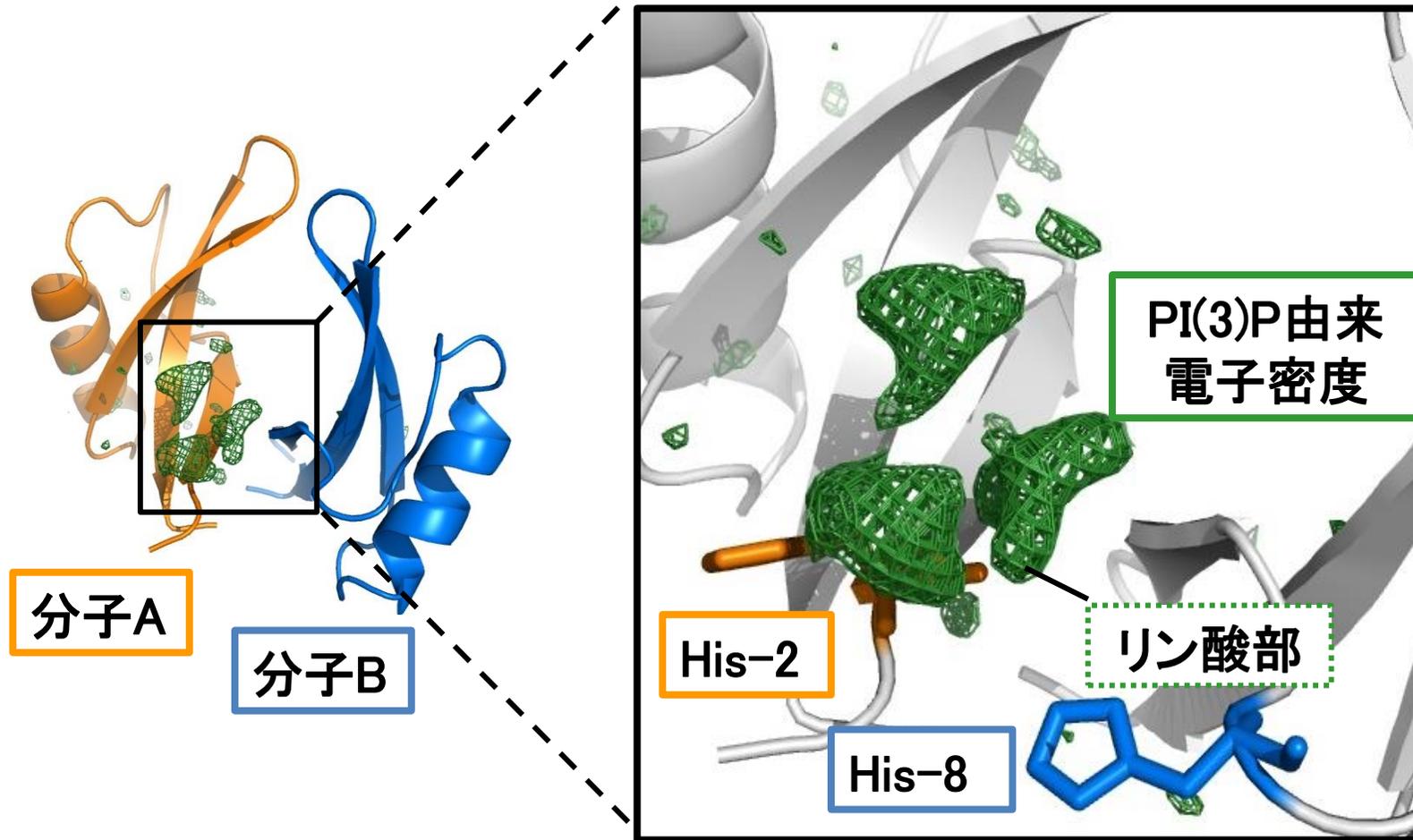
Membrane Lipid Strips



Sphingo Strips



OsAFP1のX線結晶構造解析



OsAFP1の断片ペプチドとその特徴



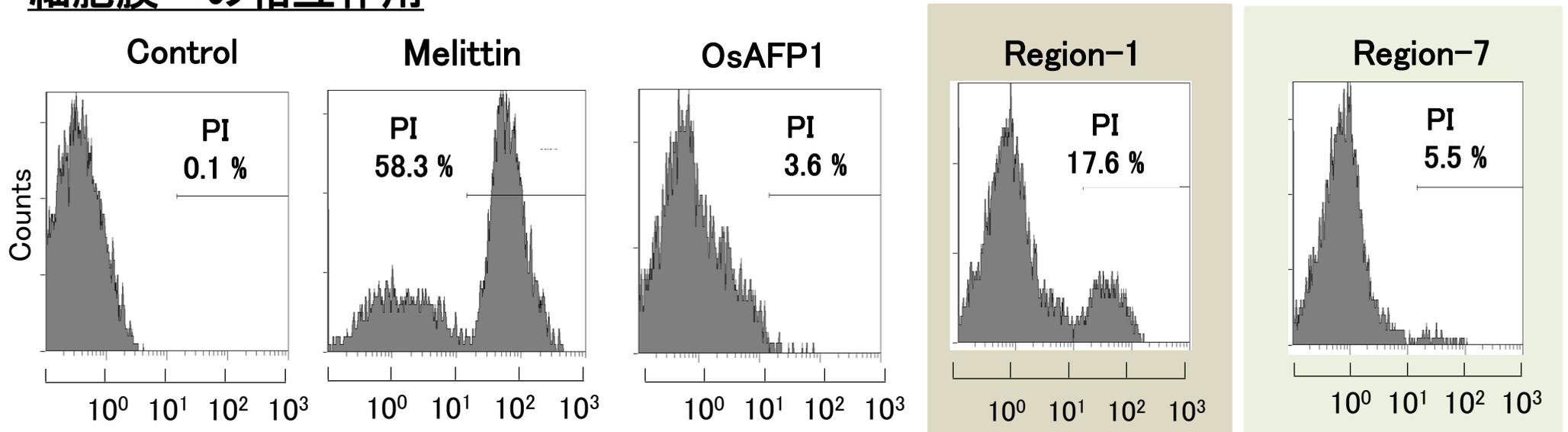
設計したペプチド



C. albicans に対する抗真菌活性

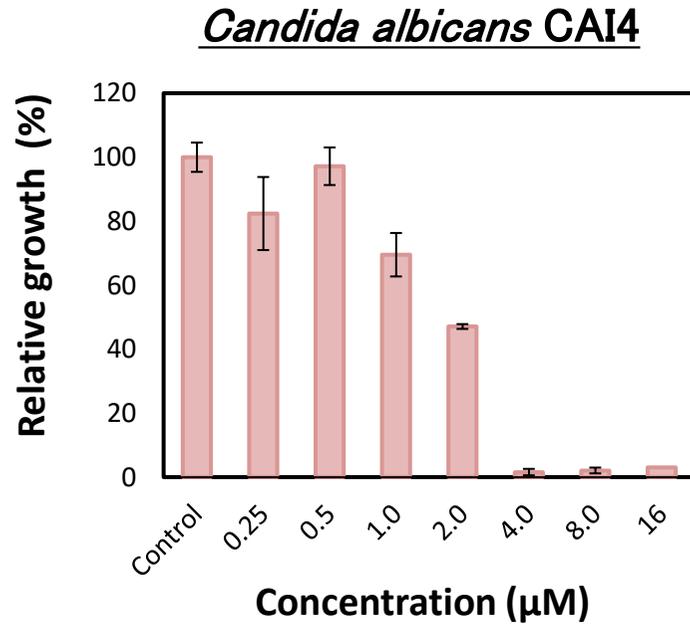
	OsAFP1	Region-1	Region-2	Region-3	Region-4	Region-5	Region-6	Region-7	Region-8
IC ₅₀ (μM)	2.4	5.5	19.1	>25	> 25	>25	> 25	10	12.9

細胞膜への相互作用

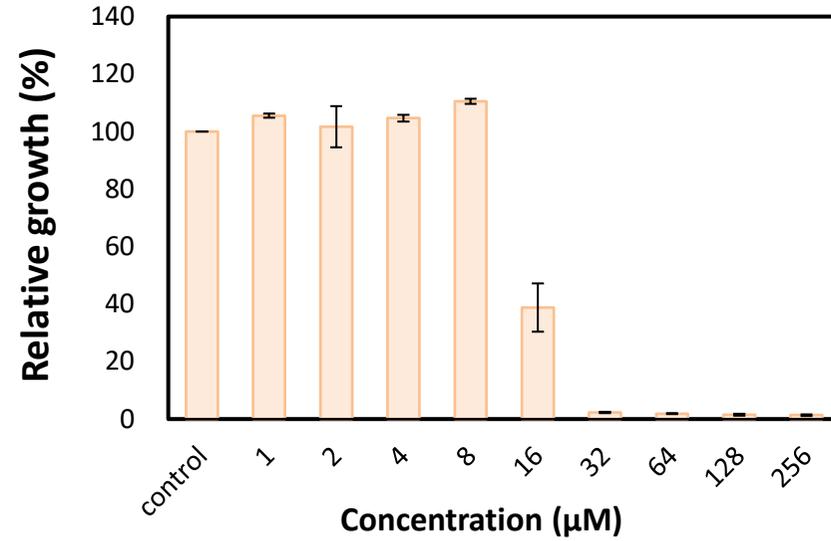


OsAFP1-8Lペプチドの抗真菌活性

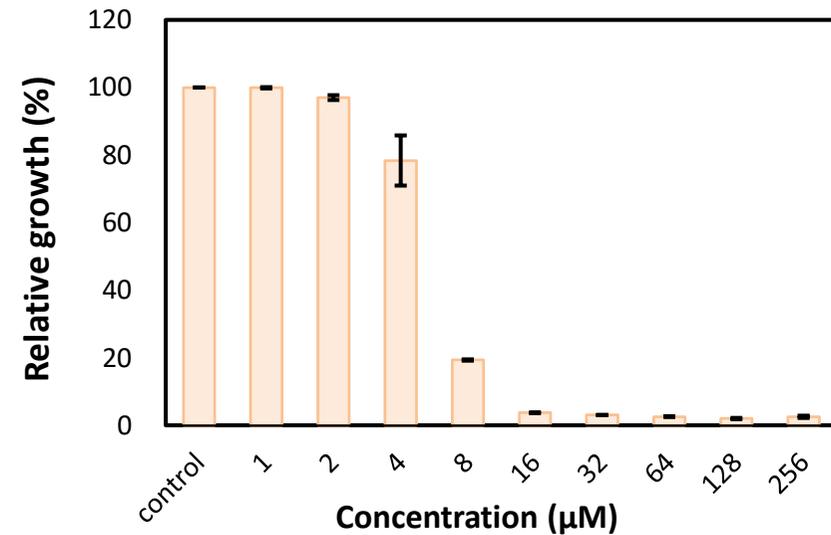
OsAFP1



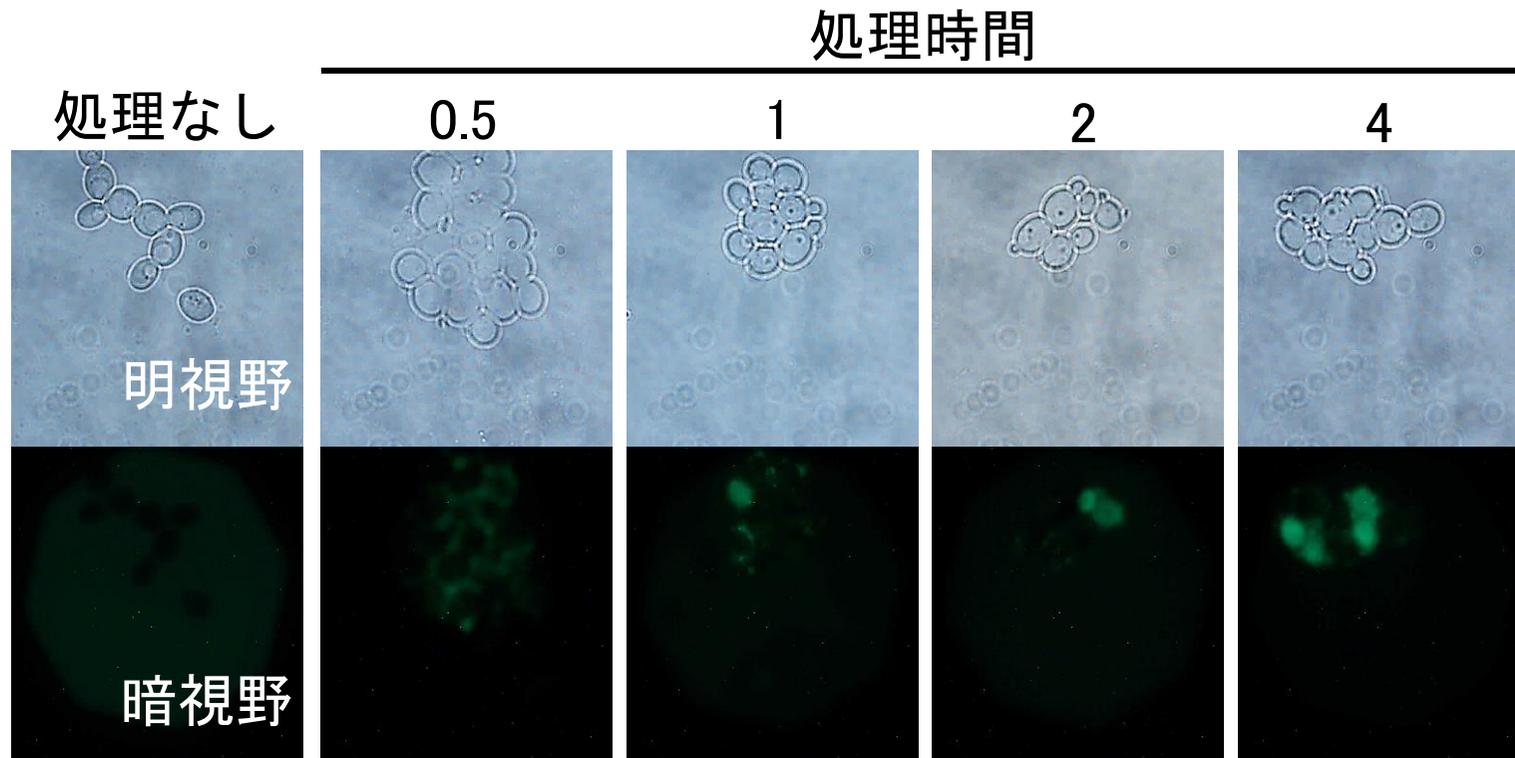
Candida albicans CAI4



Saccharomyces cerevisiae BY4742



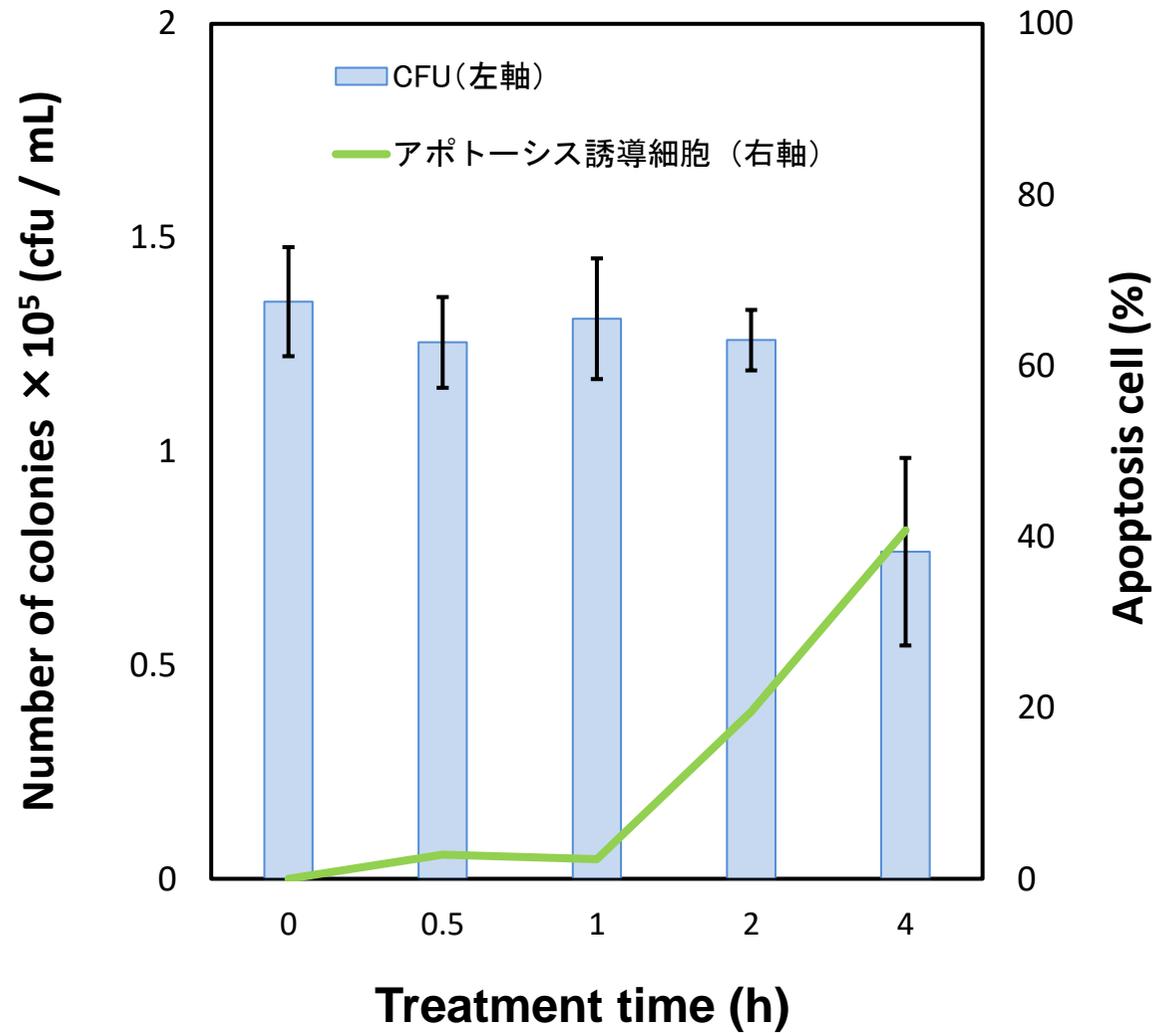
OsAFP1-8Lペプチドのアポトーシス誘導



処理時間 (h)	0	0.5	1	2	4
細胞数 (個)	119	141	129	133	130
アポトーシス誘導細胞数 (個)	0	4	3	26	53

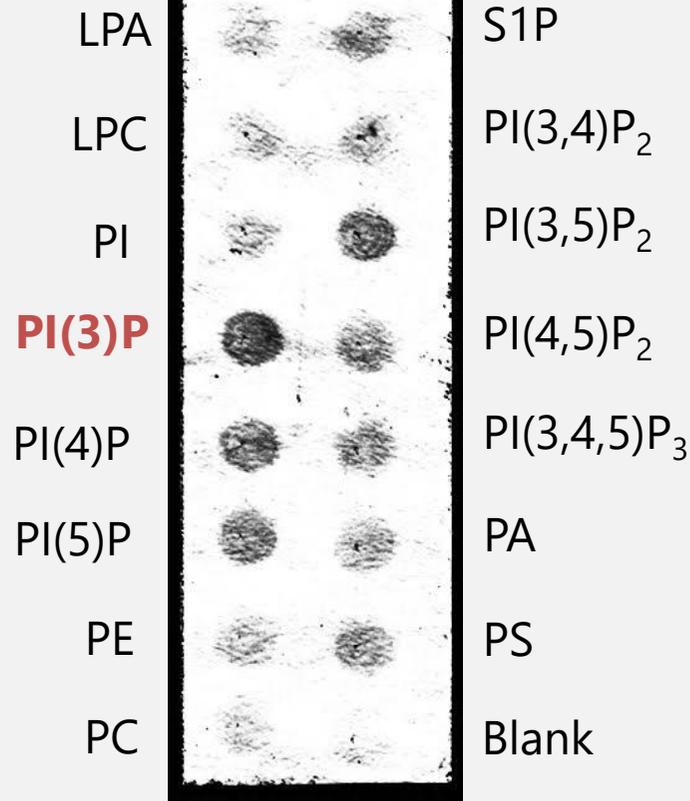
*注 全細胞と蛍光細胞を計数して割合を算出

OsAFP1-8Lペプチドのアポトーシス誘導



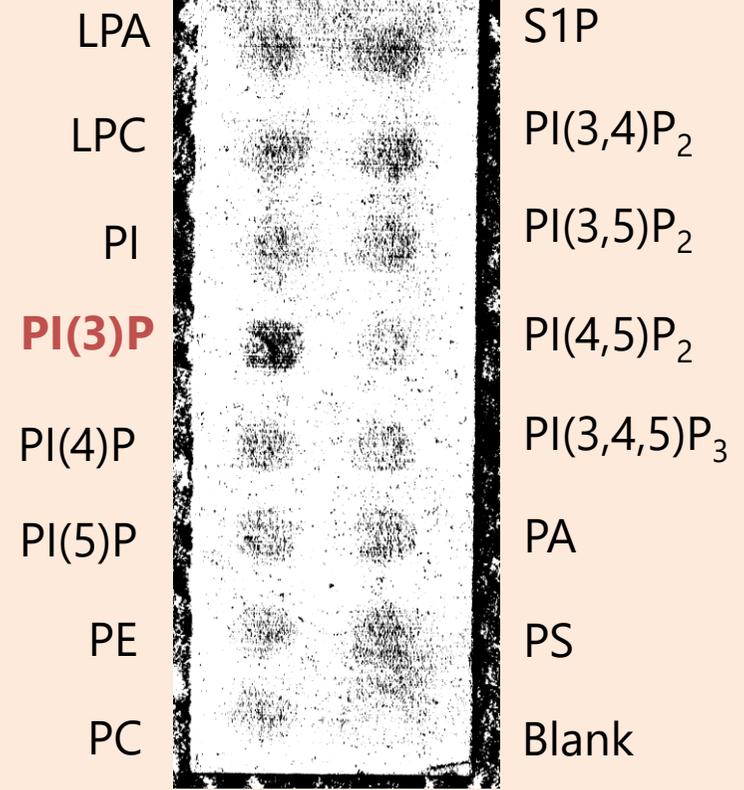
OsAFP1-8Lペプチドにおける脂質結合試験

OsAFP1



PI(3)P > PI(3,5)P₂ ≒ PI(4)P

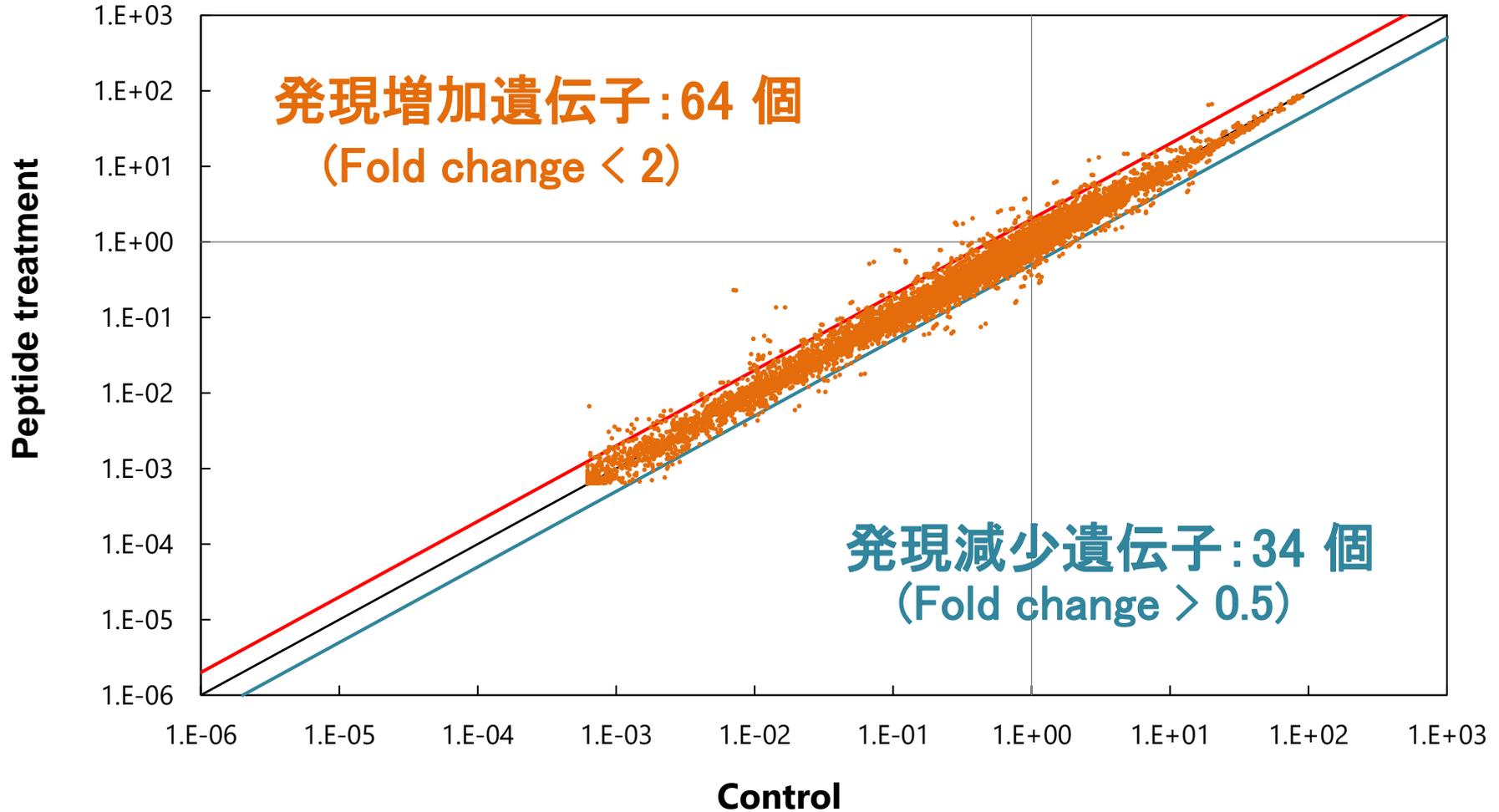
OsAFP1-8L



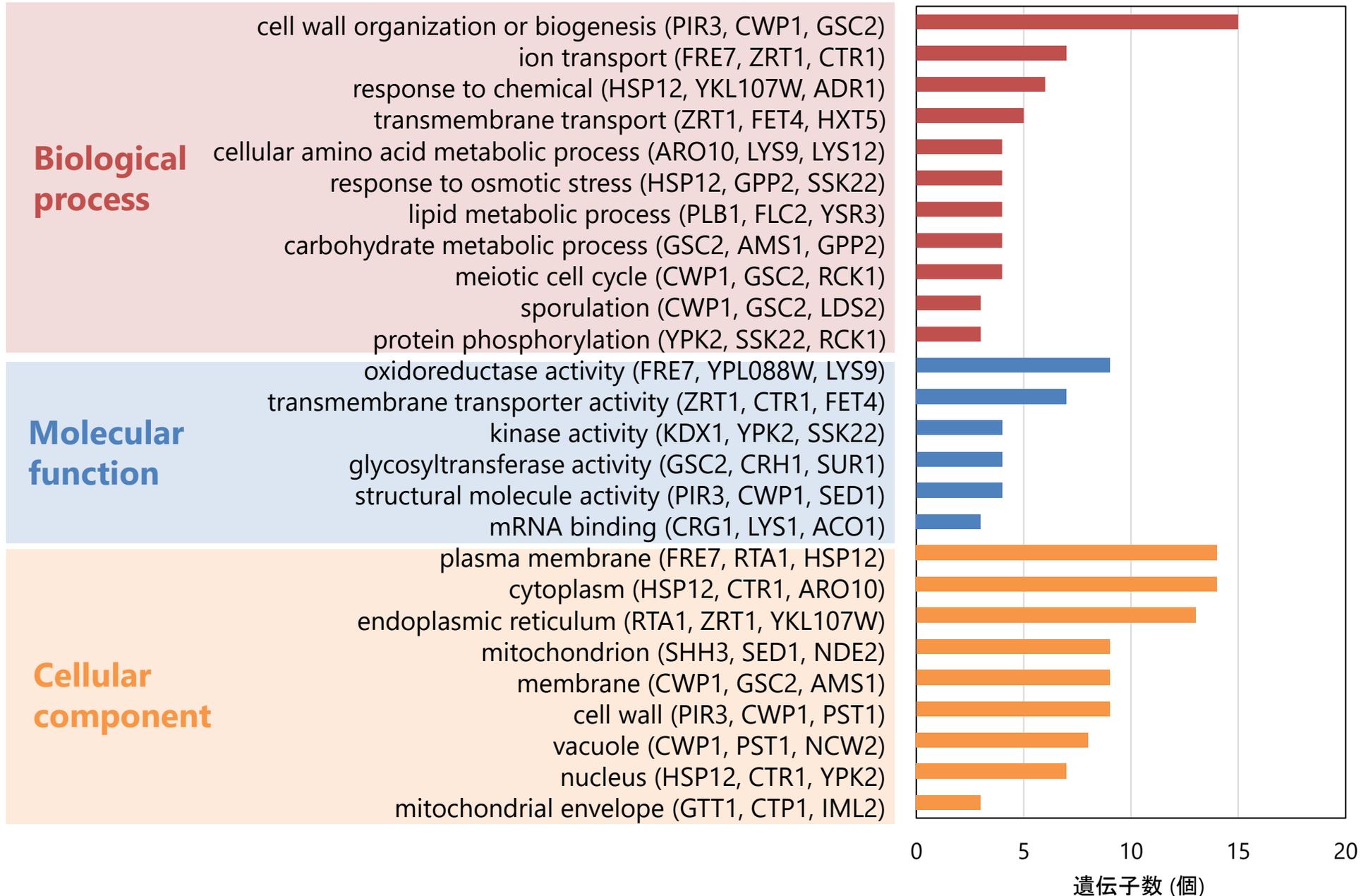
PI(3)P > PI(3,4)P₂ ≒ S1P > PI(3,5)P₂

OsAFP1-8Lペプチドのマイクロアレイ解析

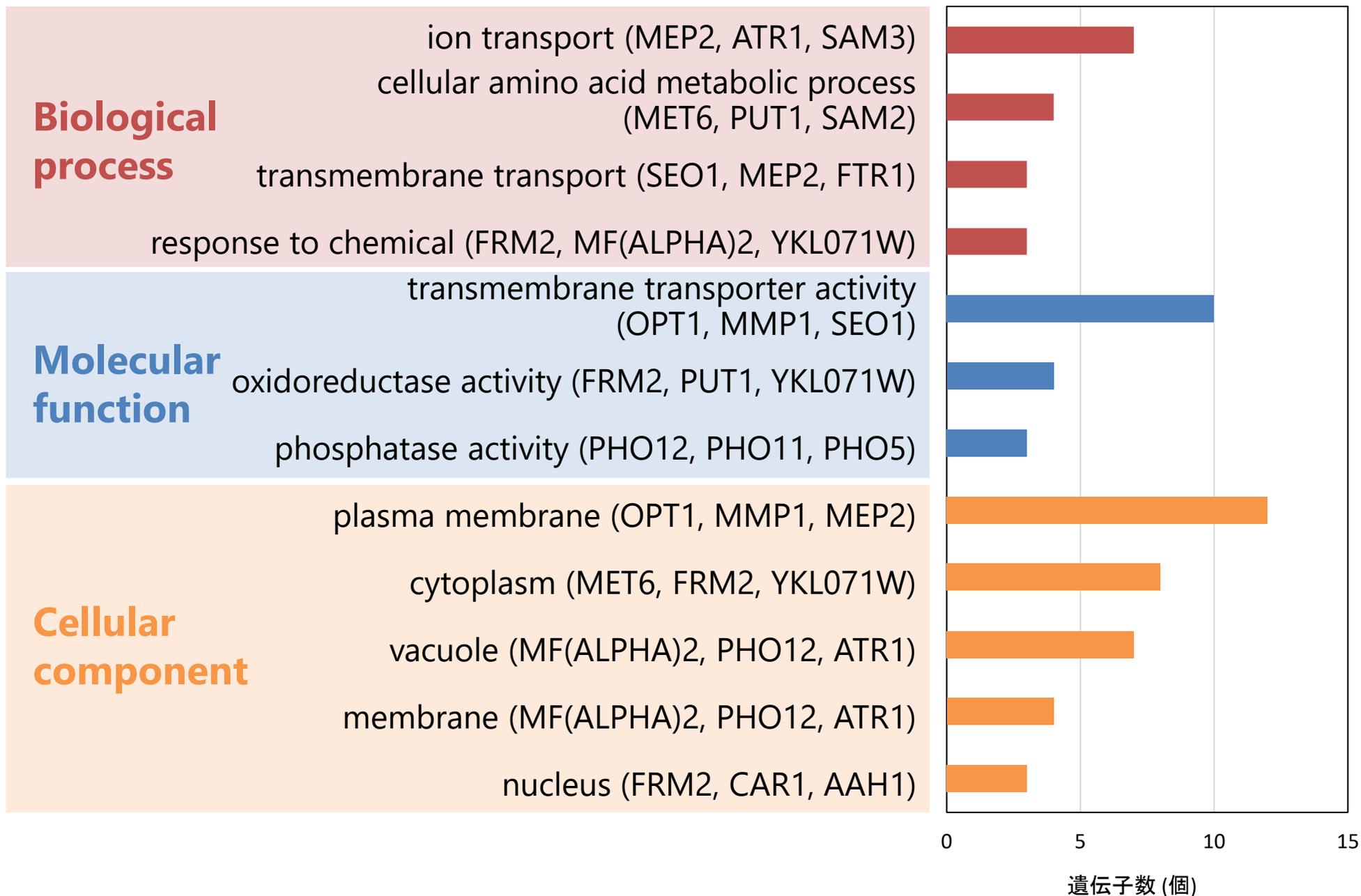
Scatter Plot



Gene Ontology 解析 (発現増加)

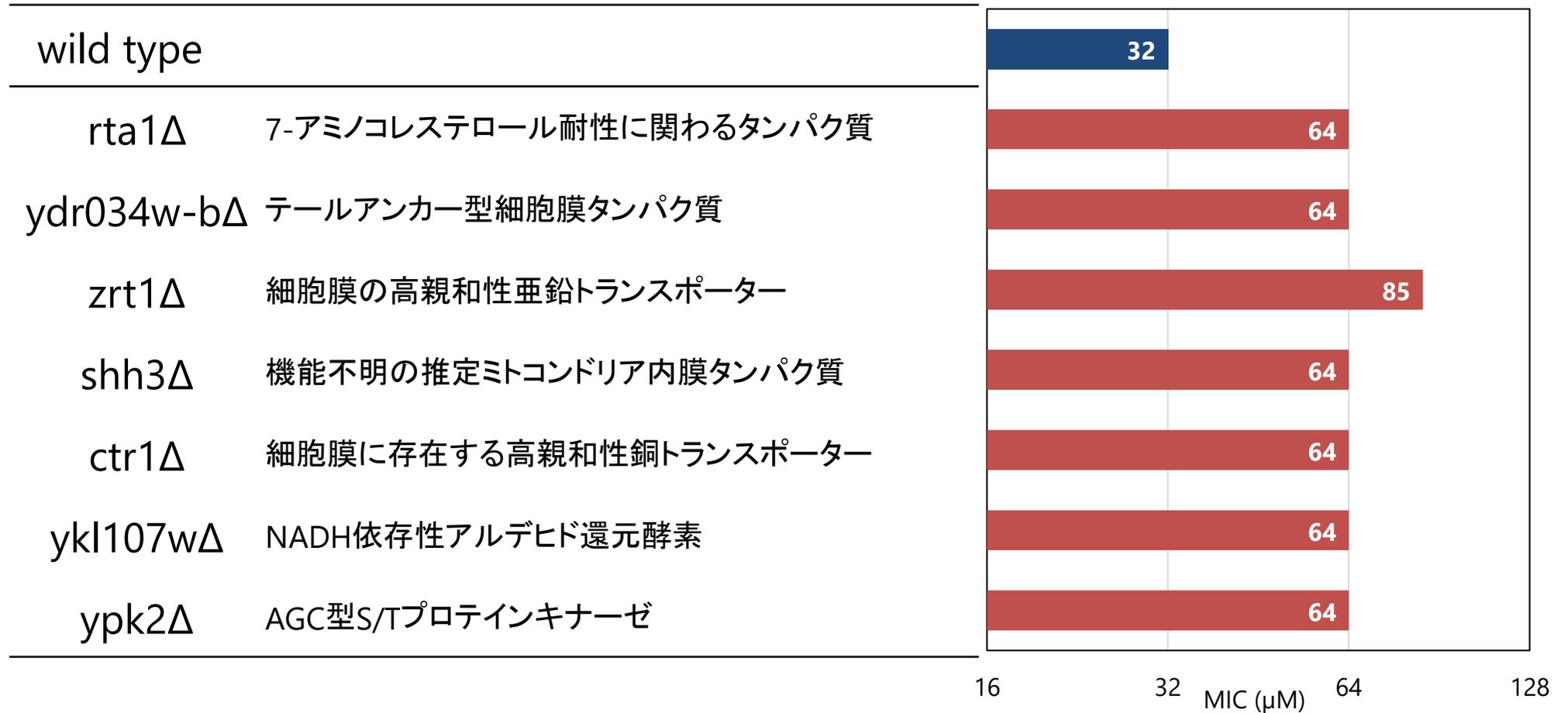


Gene Ontology 解析 (発現減少)

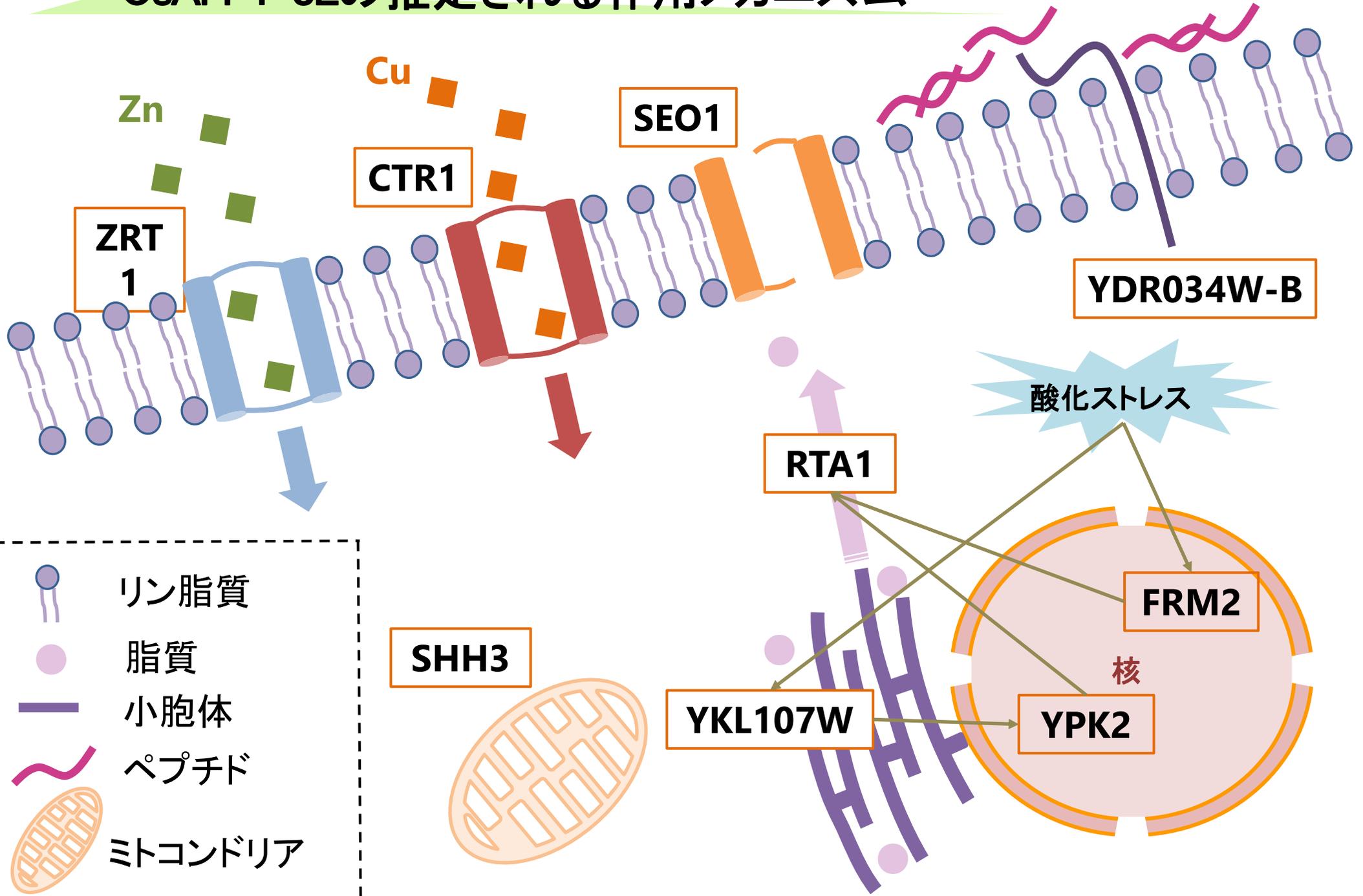


MICが上昇したノックアウト株

遺伝子発現変動が大きい遺伝子ノックアウト株の抗真菌活性

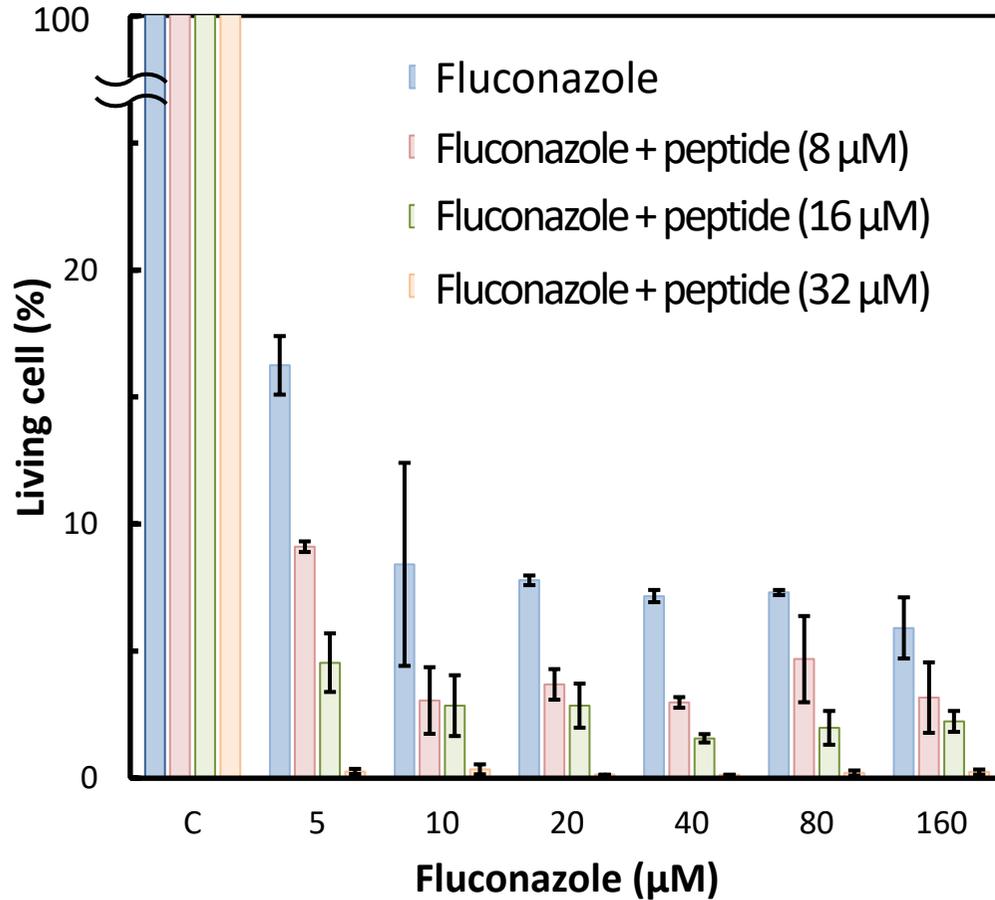


OsAFP1-8Lの推定される作用メカニズム



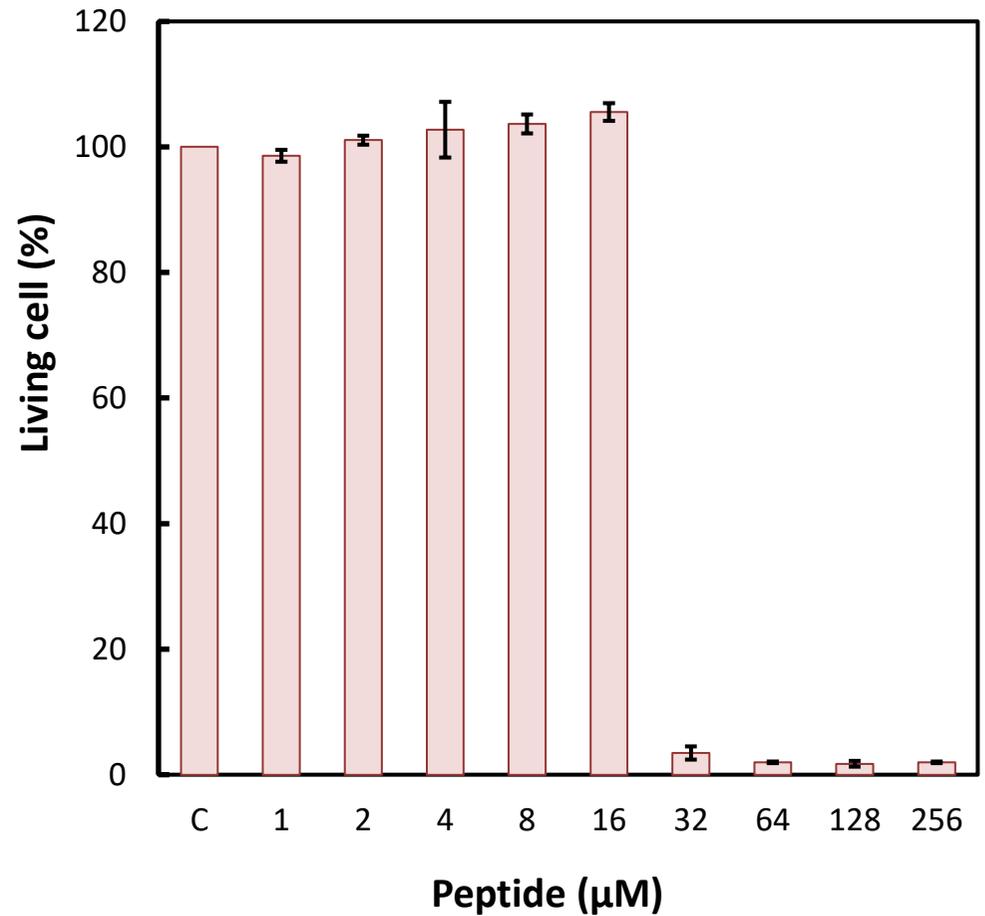
既存抗真菌薬との協奏効果

Fluconazole & OsAFP1-8L



*注 C: Fluconazol 0 μM + peptide 0 μM

OsAFP1-8L



*注 C: OsAFP1-8L 0 μM

植物由来新規抗菌ペプチドのまとめ

既存抗真菌薬

系統	一般名
イミダゾール系	ルリコナゾール
	ラノコナゾール
	ケトコナゾール
	ネチコナゾール
	ビホナゾール
モルホリン系	アモロルフィン
チオカルバミン酸系	リラナフタート
アリルアミン系	テルビナフィン
ベンジルアミン系	ブテナフィン

作用機序



作用機序

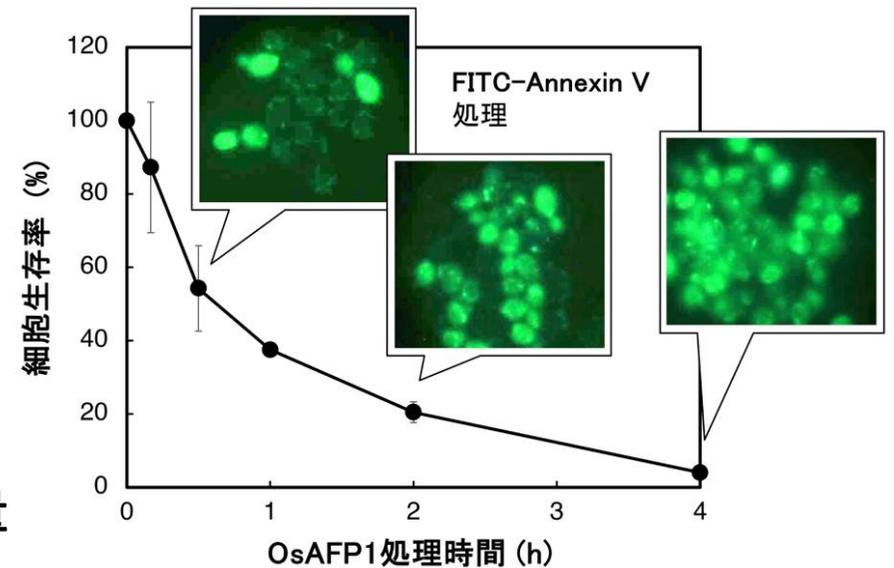
新規抗真菌薬(第II層臨床試験中)

Pezadeftide.....植物ディフェンシン
(分子量:5486、49アミノ酸残基)

分子量



OsAFP1-8L
イネディフェンシン由来ペプチド
(11アミノ酸残基)



新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来の抗真菌薬の問題点であった、画一的な作用メカニズムを改良した抗真菌薬を開発した。
- 現在開発中の植物ディフェンシンを用いた抗真菌薬と比較して、1/5程度までそのアミノ酸配列を短鎖化することができており、新たな作用メカニズムを示す抗真菌薬をより低コストで生産することが可能となった。

想定される用途

- 表在性真菌症に対する抗真菌薬
- ペプチド性であることから、食品や化粧品分野への展開も可能と思われる。

実用化に向けた課題

- 真菌臨床株に対する効果を検証する。
- ヒト培養細胞を用いて安全性と毒性を評価する。新しい作用メカニズムを持つことから、既存薬とは異なる効果や副作用が現れる可能性があるため慎重に検証を進める。
- 薬剤の使用状況を想定した環境における安定性の検証を行い、必要に応じた改良を進める。

企業への貢献、PRポイント

- 新しい作用メカニズムは既存薬とは異なる効果を発揮するため、市場において差別化された製品として競争優位性を確保可能。
- 本技術の導入にあたり必要な追加実験を行うことで科学的な裏付けを行うことが可能。
- 本格導入にあたっての技術指導等。

本技術に関する知的財産権

発明の名称：抗真菌ペプチドおよび医薬組成物

出願番号：特願2024-163775

出願人：国立大学法人新潟大学

発明者：落合 秋人

お問い合わせ先

新潟大学 社会連携推進機構

TEL 025-262-7554

FAX 025-262-7513

e-mail onestop@adm.niigata-u.ac.jp